

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. Schölmerich

UNTERSUCHUNGEN ZUM VERHALTEN DER
ALKALISCHEN LEUKOZYTENPHOSPHATASE
BEIM MENSCHEN

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

CHRISTA GRÄTZEL

aus Neuwürschnitz / Erzgebirge

Mainz 1966

Aus der Medizinischen Universitäts-Klinik der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz
Direktor: Professor Dr. Schölmerich

Untersuchungen zum Verhalten der alkalischen
Leukozytenphosphatase beim Menschen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der Hohen Medizinischen
Fakultät der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Christa Grätzel

aus Neuwürschnitz / Erzgebirge

Mainz 1966



Dekan: Professor Dr. Borneff

Referent: Professor Dr. Tilling

Korreferent: Professor Dr. Voit

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Fragestellung	2
Chemie	3
Untersuchungstechnik	7
Durchgeführte Untersuchungen	9
Protokollbeispiel	10
Übersicht über Ergebnisse	11
Bestimmung der Mittelwerte u. Häufigkeitsverteilung	12
Diskussion zur Bestimmung der Mittelwerte	21
Berechnung des Meßfehlers	23
Diskussion zur Berechnung des Meßfehlers	26
Verhalten des Enzyms im Tagesprofil	27
Verhalten der Leukozyten im Tagesprofil	30
Korrelationsprüfungen	32
Diskussion zu den Korrelationsprüfungen	35
Zusammenfassung	36
Literaturverzeichnis	38

U n t e r s u c h u n g e n z u m V e r h a l t e n d e r A l k a l i s c h e n L e u k o z y t e n p h o s p h a t a s e (a L P) b e i m M e n s c h e n .

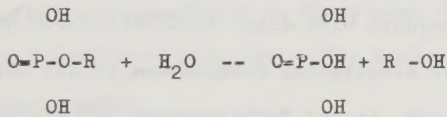
Die in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen über die aLP
sollen Aufschluß geben über

1. die klinische Anwendbarkeit von zwei verschiedenen Auswertungsverfahren der aLP
 - a) durch Bestimmung eines Aktivitätsindex
 - b) durch Bestimmung der Prozentanteile enzympositiver neutrophiler Granulozyten
2. das Verhalten der aLP im Tagesprofil bei gesunden Versuchspersonen, bei Patienten mit reaktiven Leukozytosen und Blutkrankheiten
3. die Korrelation der aLP mit Serumfaktoren.

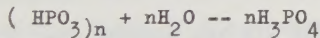
C h e m i e

Die im alkalischen Milieu reagierenden sog. alkalischen Phosphatasen gehören zu den Hydrolasen, die unter Beteiligung von Wasser die Spaltung und Synthese chemischer Verbindungen katalysieren. Aus Versuchen mit radioaktivem Sauerstoff geht hervor, daß sie die P-O-Bindung der Phosphorsäureester wie folgt spalten (27):

- a) die Phosphomonoesterasen hydrolysieren Monoester der Phosphorsäure (z.B. Glucose-6-phosphat $\rightarrow$ Glucose + Phosphat)



- b) die Phosphodiesterasen hydrolysieren Substrate, wie Nucleinsäuren, unter Spaltung von nur einer Esterbindung
- c) Pyrophosphatasen spalten die Pyrophosphatbindung von Salzen und Estern der Pyrophosphorsäure
- d) Metaphosphatasen hydrolysieren Metaphosphat zu Orthophosphat (28)



Die optimale Aktivität herrscht bei einem pH zwischen 9,2 und 9,6 vor; verstärkt wird sie durch bivalente Kationen, wie Mg^{++} , gehemmt durch CN^- , PO_4^{---} und Thiole (Cystin) (28).

Die alkalischen Phosphatasen haben im Organismus wahrscheinlich differente Bildungsstätten. Die osteoblastische Produktion der alkalischen Phosphatase unter physiologischen Verhältnissen und ihre Erhöhung als wichtiges Symptom mit Knochenveränderung

einhergehender Krankheitszustände (Osteitis deformans, Osteomalazie, Knochensarkom usw.) ist bekannt. Ferner wird vermutet, daß alkalische Phosphatase zu den organellenspezifischen Enzymen der Leber gehört und in den Gallenkapillaren produziert wird (30).

Ihre physiologischen Funktionen sind noch nicht vollständig aufgeklärt. Wahrscheinlich sind sie am Auf- und Abbau der Nucleotide bei der Resorption, im Intermediärstoffwechsel der Fette und Kohlenhydrate, bei der Bildung des Knochens und an den Sekretions- und Resorptionsvorgängen der Nierentubuli beteiligt (29). Gestützt wird diese Vermutung durch das reichliche Vorkommen der alkalischen Phosphatase in der Darmschleimhaut, der Nierenrinde, in der Wachstumszone der Knochen, in der Leber, in Mamma, Plasma, Gehirn, im lymphatischen Gewebe und in den Leukozyten. Nach enzymkinetischen und immunologischen Untersuchungen sollen die Fermente von Milch, Mamma, Leber, Niere und Knochen identisch, doch verschieden von dem der Darmschleimhaut sein (28).

Die Aktivität aller untersuchten alkalischen Phosphatasen liegt bei Frauen etwa 20% niedriger als bei Männern, bei Kindern höher als bei Erwachsenen und nimmt mit zunehmendem Alter ab. Die alkalische Leukozytenphosphatase (aLP) ist eine Phosphomonoesterase, die in alkalischem Milieu Phosphorsäureester spaltet. Sie ist im Zellstoffwechsel an De- und Transphosphorylierungsvorgängen maßgeblich beteiligt.

Kay (6) vermutete 1929 erstmals alkalische Phosphatase in den Leukozyten. 1939 konnte Umeno (7) das Enzym in den Leukozyten

des Kaninchens nachweisen. 1946 gelang es Wachstein (3) erstmalig, die alkalische Phosphatase der Blutzellen darzustellen. Er verwendete die von Gomori (4) und Takamatsu (5) unabhängig voneinander entwickelte Succedanmethode, wobei die freigesetzte Phosphatgruppe als chromogene Vorstufe und Na- α -glycerophosphat als Substrat benutzt wird. An enzymatisch aktiven Stellen der Zelle kommt es zum Niederschlag von Kobaltsulfid.

1944 wurde von Menten, Junge und Green (8) die Azofarbstoffkupplungsmethode für Nierengewebe angegeben, die seit 1951 an Blutzellen verwendet wird. Das Ferment ist in den Zellen des peripheren Blutes ausschließlich im Zytoplasma der stab- und segmentkernigen neutrophilen Granulozyten nachweisbar. Jüngere Zellformen sind negativ.

Die positive Reaktion im Kern, die Plum, Wachstein und Kerpola beobachteten, sieht Friederici (7) als Artefact an. Eosinophil granulierte Leukozyten geben keine Reaktion der aLP.

Differentialdiagnostisch kann der unterschiedliche Fermentgehalt bei hämatologischen Erkrankungen ausgenutzt werden. Klinische Bedeutung haben Verminderungen der Aktivität bei Myelosen und Steigerungen derselben bei Osteomyelosklerosen. Erhöhung bei extrahepatischem Verschlußikterus, die verschiedentlich behauptet wurde (9, 35) konnte nicht verlässlich reproduziert werden (10).

Bei verschiedenartigen Erkrankungen wie Pneumonien, Tuberkulose, akuten Infekten und während der Schwangerschaft wurde eine Erhöhung der aLP beobachtet. Als Ursache wird eine

Stimulierung der Nebennierenrinde vermutet, da sich eine Aktivierung des Enzyms in vitro durch ACTH und Cortison nachweisen läßt (11).

Genetische Veränderungen spielen dann eine Rolle, wenn Isoenzyme auftreten und zu ständiger Aktivitätserhöhung führen, wie bei Polyzythämie (12). Die Hyperaktivität bei Mongolismus und der Fermentdefekt bei chronischer Myelose gehen mit einer Chromosomenaberration im Autosomenpaar 21 einher (19). Ob dieses 1960 in Philadelphia von einer Forschergruppe (31) beschriebene Chromosom Beziehungen zur aLP hat, ist noch nicht geklärt. Beim Mongolismus könnte die Erhöhung der Fermentaktivität durch infektiösbedingte immunpathologische Vorgänge hervorgerufen werden (18).

U n t e r s u c h u n g s t e c h n i k

Zum Nachweis der aLP wurde ihre hydrolytische Funktion ausgenutzt. Als Grundlage der Untersuchungen haben wir das histochemische Azokupplungsverfahren verwendet, das von Kaplow (1) in die Hämatologie eingeführt wurde, modifiziert nach Merker und Heilmeyer (2).

Es handelt sich hierbei um eine Simultanmethode, in der Phosphat-spaltung und Bildung eines sichtbaren Farbniederschlages (Azofarbstoff) in einem Entwicklungsschritt unmittelbar nebeneinander am Ort der Enzymaktivität erfolgen. Durch die Phosphatase des Plasmas wird α -Naphthylphosphorsäureester gespalten. Die Phenolkomponente (α -Naphthol) kuppelt mit dem Diazoniumsalz (Variaminblausalz B conc.) zu einem Azofarbstoff. Veronal- Na fungiert als Puffer, da die Farbsalzbildung nur in alkalischem Medium erfolgt.

1. 45 sec. Fixation des lufttrockenen Ausstriches in Formol-Methanol-Gemisch (1 Teil 36%iges Formaldehyd + 9 Teile reines Methanol)
2. Spülung in fließendem Wasser und Lufttrocknung.
3. 60 min. Inkubation bei 4° - 6° C in folgender Substratmischung:
100 ml Veronal-Na 2%
100 mg Variaminblausalz
50 mg Naphthylphosphat
4. Spülung in fließendem Wasser und Lufttrocknung.
5. 3-4 min Gegenfärbung mit Hämalan.
6. Abspülung und Lufttrocknung.

Die Auswertung erfolgte:

1. nach der sog. Scoring-Methode. Dabei werden die Granulozyten je nach Phosphatasegehalt in Aktivitätsstufen 0-5 eingeordnet. Die Anzahl der positiven Zellen wird mit der jeweiligen Ordnungszahl multipliziert. Der Aktivitätsindex ergibt sich durch Addition der gefundenen Werte.
2. durch Bestimmung des Prozentgehaltes enzympositiver neutrophiler Granulozyten.

Beurteilung der Enzymaktivität:

0 = keine Reaktion

1 = braune Färbung im Zellzentrum diffus oder granulär, eben beginnend.

2 = inhomogene Farbstoffniederschläge zu Zellperipherie fortschreitend, Plasmarand meist noch frei.

3 = homogen verteilte Niederschläge in der ganzen Zelle, meist granulär. Zelle noch transparent, Plasma noch erkennbar.

4 = fleckige schwarze Farbstoffpräzipitate. Kern noch gut abgrenzbar.

5 = homogene Ausfüllung der Zelle mit schwarzen Farbstoffpräzipitaten. Zellkern teils überlagert, teils noch erkennbar.

Durchgeführte Untersuchungen:

An 50 Normalpersonen, 30 Patienten mit reaktiven Leukozytosen, 5 mit myelischen Leukämien und 4 mit Paramyeloblastenleukämien verschiedenen Alters und Geschlechtes (Tab. 1) bestimmten wir das Verhalten der aLP.

Tab. 1 Alters- und Geschlechtsverteilung

Alter	Gesunde		reaktive Leukozyt.		myel. Leuk.		akute Leuk.	
Jahre	m.	w.	m.	w.	m.	w.	m.	w.
-19	2	2	1	1	-	-	-	-
-29	5	5	3	2	-	-	-	1
-39	3	4	1	-	-	-	1	-
-49	3	3	3	2	-	-	-	-
-59	6	10	3	2	-	3	-	1
≥60	-	7	7	5	1	1	1	-

Von jedem Probanden wurden zu fünf festgelegten Tageszeiten für die Doppelbestimmung je zwei Blutaussstriche gemacht und nach der o.a. Methode gefärbt. Für die Bestimmung der aLP zählten wir jeweils 200 segmentkernige Granulozyten aus. Gleichzeitig bestimmten wir die Leukozyten. Außerdem ermittelten wir am gleichen Tag die Werte der alkalischen Serumphosphatase, der Elektrophorese, der BSG und des Hb. Als Beispiel soll die nachfolgende Synopse dienen (Abb.1).

Abb. 1

B e i s p i e l

Protokoll vom 9.4.1965

Name Kayser, Gertrude
Geb.Dat. 8.12.07
Station 4Ia
Diagnose Vegetative Dystonie

Ery 4,8
Hb 15,9
BKS 2/6
Alk. Serumphosphatase 56 U
Zytostatika -

Elektrophorese:		Gesamt E. 6,9	
	Relativ		Absolut
Albumin	(53,9 $\pm$ 2,75%) = 49,5		(3,52-4,33%) = 3,41
α_1 -Globulin	(5,0 $\pm$ 0,39") = 6,5		(0,33-0,40") = 0,45
α_2 -Globulin	(8,1 $\pm$ 1,17") = 9,9		(0,53-0,65") = 0,68
β -Globulin	(12,5 $\pm$ 1,28") = 14,9		(0,81-1,00") = 1,03
γ -Globulin	(20,1 $\pm$ 1,94") = 19,2		(1,31-1,62") = 1,33

Leuko	A k t i v i t ä t s k l a s s e n										Aktiv.		% enzym.			
	0		I		II		III		IV		V		Index		pos. Neutr.	
Anz.	n.	d.	n.	d.	n.	d.	n.	d.	n.	d.	n.	d.	n.	d.	n.	d.
4300	146	134	32	34	22	30	3	-	-	-	-	38,0	47,0	27,0	32,0	
4600	170	168	22	18	8	14	-	-	-	-	-	19,0	23,0	15,0	16,0	
6700	152	154	24	20	24	26	-	-	-	-	-	36,0	36,0	24,0	23,0	
6500	164	162	22	16	14	22	-	-	-	-	-	25,0	30,0	18,0	19,0	
8200	166	166	20	16	12	18	2	-	-	-	-	25,0	26,0	17,0	17,0	

Profil

n	159,6	24,0	16,0	1,0	-	-	28,6	20,2
d	156,8	20,8	22,0	-	-	-	32,4	21,4

E r g e b n i s s e

1. Bestimmung der Mittelwerte und der Häufigkeitsverteilung des Enzyms.
2. Berechnung des Meßfehlers für Aktivitätsindex und Prozentanteil der enzympositiven neutrophilen Granulozyten.
3. Das Verhalten des Enzyms im Tagesprofil bei gleichzeitiger Leukozytenzählung:
 - a) bei Normalpersonen
 - b) bei Patienten mit reaktiven Leukozytosen
 - c) bei Blutkrankheiten
4. Korrelationsprüfungen zwischen der aLP und den Leukozyten, der alkalischen Serumphosphatase, den Eiweißfraktionen, dem Hb und der BSG.

Bestimmung der Mittelwerte und Häufigkeitsverteilung des Enzyms

In Tab. 2 wurden die Ergebnisse für den Mittelwert ($\bar{x}$), für die Standardabweichung der Einzelbestimmungen (s), für die Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) und Maximum und Minimum des Mittelwertes der 50 Normalpersonen (n) zusammengestellt. Die Zeiteinteilung bezieht sich auf die 5 Tagesbestimmungen (t). Dargestellt sind Einzel- und Doppelbestimmungen.

Tab. 2

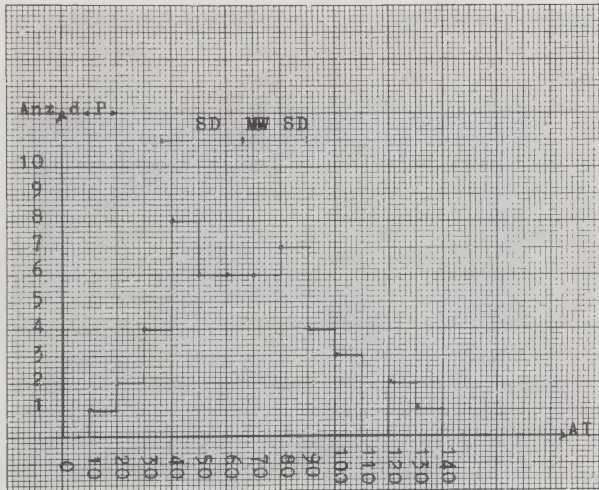
t	n	$\bar{x}$		S		$S_{\bar{x}}$		Max.		Min.	
1	50	66,00	66,42	30,65	29,89	4,33	4,22	121,0	124,0	13,0	10,0
2	50	63,67	62,67	28,96	28,66	4,09	4,05	149,0	125,0	8,0	8,0
3	50	62,66	60,78	28,49	28,25	4,02	3,99	128,0	130,0	7,0	6,0
4	50	62,71	62,30	27,46	25,79	3,88	3,67	113,0	104,0	10,0	14,0
5	50	63,89	62,61	29,56	28,06	4,18	3,96	121,0	114,0	14,0	13,0
Ges.	50	63,77	63,67	27,48	26,53	3,88	3,75	123,5	119,4	10,4	10,2

=====

Der Mittelwert betrug $\bar{x} = 63,77$ (Standardabweichung S.D. = 27,48)
Der Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$) im klinischen Sinn lag zwischen
8,81 und 118,73.

Die Verteilung des Aktivitätsindex bei 50 Normalpersonen wurde in Abbildung 2 dargestellt.

Abb. 2



Auf der Abszisse wurde der Aktivitätsindex aufgetragen und auf der Ordinate die Anzahl der Probanden. Zur Orientierung wurde der Mittelwert (MW) mit der Standardabweichung (SD) eingezeichnet.

Die Verteilung entspricht in etwa einer Normalverteilung. Ein exakter Test wurde nicht durchgeführt.

Für den Prozentanteil der enzympositiven neutrophilen Granulozyten errechneten wir ebenfalls den Mittelwert ($\bar{x}$), die Standardabweichung der Einzelbestimmungen (s), die Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) und Maximum und Minimum des Mittelwertes der 50 (n) Normalpersonen (Tab.3)

Tab. 3

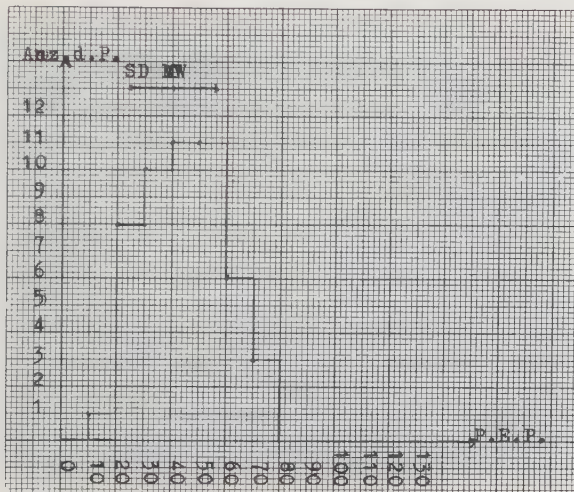
t	n	$\bar{x}$		s		$s_{\bar{x}}$		Max.		Min.	
1	50	41,12	40,98	16,43	16,48	2,32	2,33	67,00	67,50	9,00	7,00
2	50	40,62	40,48	15,75	15,48	2,22	2,19	81,00	74,00	7,00	6,00
3	50	39,74	39,22	15,96	15,25	2,25	2,15	72,50	77,50	5,00	5,00
4	50	39,91	40,18	15,29	15,27	2,16	2,15	73,00	69,00	8,00	10,0
5	50	40,63	40,90	16,27	15,72	2,30	2,22	69,00	68,00	10,0	9,0
Gs.50		40,36	40,35	15,20	14,97	2,15	2,11	72,10	71,00	7,80	7,40
=====											

Der Mittelwert betrug $\bar{x}$ 40,36 (S.D. 15,20).

Der Normalbereich ($\bar{x} \pm 2s$) im klinischen Sinn lag zwischen 9,96 und 70,76.

In Abbildung 3 wurde die Häufigkeitsverteilung des Prozentanteiles der enzympositiven neutrophilen Granulozyten dargestellt.

Abb. 3



Auf der Abszisse wurde der Prozentanteil der enzympositiven neutrophilen Granulozyten aufgetragen, auf der Ordinate die Anzahl der Probanden. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sind eingezeichnet.

Bei den 30 Patienten mit reaktiven Leukozytosen wurden die gleichen Untersuchungen durchgeführt. In Tabelle 4 sind die Ergebnisse für den Mittelwert ($\bar{x}$), für die Standardabweichung der Einzelbestimmungen (s), für die Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$) und Maximum und Minimum wiedergegeben.

Tab. 4

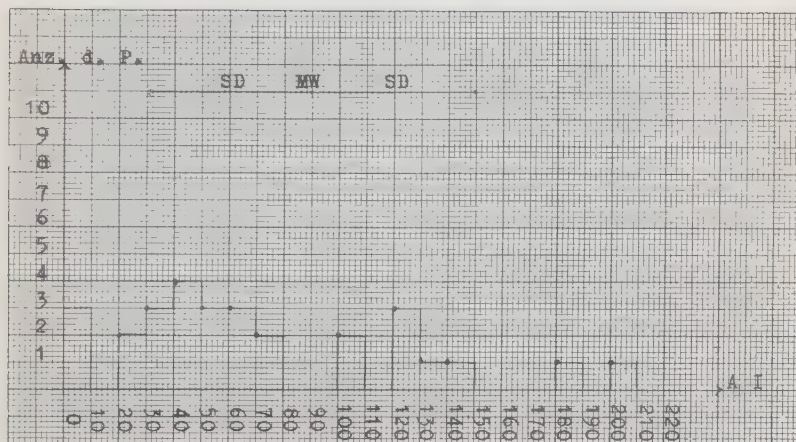
t	n	$\bar{x}$		s		$s_{\bar{x}}$		Max.	Min.
1	27	92,83	94,48	60,49	59,30	11,64	11,41	303,0 308,5	24,0 28,0
2	27	88,18	87,00	61,86	56,20	11,90	10,81	300,0 302,0	22,0 21,0
3	27	87,79	90,33	65,34	64,35	12,57	12,38	317,0 301,5	14,0 16,0
4	27	91,75	91,79	66,37	67,57	12,77	13,00	307,5 310,5	9,0 10,0
5	27	90,05	92,44	63,50	63,24	12,22	12,17	305,0 310,0	7,0 5,0
Gs.27		90,20	91,20	62,24	60,64	11,97	11,67	306,5 306,5	25,5 20,4
=====									

Der Mittelwert betrug 90,20 (S.D. 62,24).

Der Normalbereich im klinischen Sinn lag zwischen 0 und 214,68.

Die Häufigkeitsverteilung des Aktivitätsindex bei den 30 reaktiven Leukozytosen wurde in Abb. 4 dargestellt. 27 Patienten zeigten erhöhte Aktivitätswerte, 3 waren enzymnegativ.

Abb. 4



Auf der Abszisse ist der Aktivitätsindex aufgetragen, auf der Ordinate die Anzahl der Patienten. Mittelwert (MW) und Standardabweichung sind eingezeichnet.

Ein Vergleich von Abb.2 und Abb.4 läßt erkennen, daß die beiden Verteilungen sich weitgehend überschneiden. Ein kleiner Teil der reaktiven Leukozytosen übersteigt die Normalwerte.

In Tab. 5 sind die Ergebnisse für den Prozentanteil der
 enzympositiven neutrophilen Granulozyten zusammengestellt:
 Mittelwert ($\bar{x}$), Standardabweichung der Einzelbestimmungen (s),
 Standardabweichung des Mittelwertes ($s_{\bar{x}}$), Maximum und Minimum.

Tab. 5

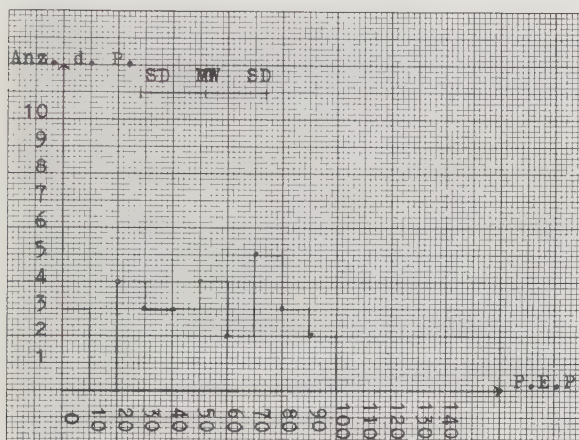
t	n	$\bar{x}$		s		$s_{\bar{x}}$		Max.		Min.	
1	27	54,25	55,55	23,68	22,28	4,55	4,28	99,00	99,50	15,00	18,00
2	27	53,35	54,55	24,86	23,66	4,78	4,55	99,00	99,00	15,00	15,00
3	27	51,88	52,31	24,18	23,96	4,65	4,61	98,00	99,00	10,00	11,00
4	27	51,85	52,38	25,31	25,97	4,87	4,99	98,50	96,50	7,00	7,00
5	27	51,03	51,53	23,58	23,29	4,53	4,48	97,00	98,00	5,00	5,00
Gs.27		52,47	53,24	23,26	22,94	4,47	4,41	98,30	98,20	17,00	15,00
=====											

Der Mittelwert betrug 52,47 (S.D. 23,26).

Der Normalbereich im klinischen Sinn lag zwischen 5,94 und
 98,99.

Die Verteilung des Prozentanteiles der enzympositiven neutrophilen Granulozyten bei den 30 Patienten mit reaktiven Leukozytosen ist in Abbildung 5 dargestellt.

Abb. 5



Auf der Abszisse wurde der Prozentanteil der enzympositiven neutrophilen Granulozyten aufgetragen, auf der Ordinate die Anzahl der Patienten. Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) sind eingezeichnet.

Bei 5 myeloischen Leukämien betrug der Mittelwert des Aktivitätsindex $\bar{x} = 144,48$ (S.D. 188,48, Max. 431,10, Min. 1,8). Dabei war die Aktivität in 2 Fällen geringer als 10. In 1 Fall stieg sie unter Mylerantherapie von 5 auf 40 an; in den beiden letzten Fällen lag der Aktivitätsindex bei 242 und 431.

Der Mittelwert des Prozentanteiles der enzympositiven neutrophilen Granulozyten betrug $\bar{x} = 41,52$ (S.D. 43,68, Max 93,4, Min. 1,4). Die Leukozytenwerte lagen zwischen 15000 und 37000.

Von 4 Patienten mit akuter Leukose waren 2 enzymnegativ. Der Mittelwert des AI der übrigen lag bei 299,25 (S.D. 82,37, Max. 372, Min. 241). Beide standen unter Cortisontherapie. Der Mittelwert des Prozentanteiles der enzympositiven neutrophilen Granulozyten lag bei 92,45 (S.D. 5,58, Max 96,70, Min. 88,20).

In 2 Fällen von Osteomyelosklerose war einer enzymnegativ, der andere hatte einen AI von 164,6.

Von 2 Patienten mit Agranulozytose konnte sich der AI des einen von 247 unter Decortinbehandlung normalisieren. Bei dem 2. Fall lagen die Werte um 410 und waren durch Decortin nicht beeinflusbar.

Der Aktivitätsindex von 4 lymphatischen Leukämien lag im Normbereich. Beim Übergang einer lymphatischen Leukämie in ein Lymphosarkom konnte ein Enzymanstieg festgestellt werden.

D i s k u s s i o n z u r B e s t i m m u n g d e r M i t t e l w e r t e

Die hohe aLP bei reaktiven Leukozytosen wird auf den allgemein gesteigerten Stoffwechsel der Zellen bei Infektionen zurückgeführt (23) und weist auf die mögliche Bedeutung des Enzyms für die granulozytäre Abwehrfunktion hin (13). Eine adäquate Fermentreaktion konnte in vitro im Pyrexalreizversuch nachgewiesen werden (20,17).

Der Enzymverlust in den Leukozyten bei akut auftretenden reaktiven Leukozytosen soll durch die Überforderung der Fermentproduktion bei plötzlich vermehrten Einstrom von Granulozyten in das Blut aus dem Knochenreservoir bedingt sein (16,17). Für die zeitweilig erhöhte Aktivität der aLP bei myeloischer Leukämie werden verschiedene Erklärungen gegeben: In der malignen Verlaufsphase, dem finalen Myeloblastenschub, bewirkt die einsetzende Proliferation wahrscheinlich den Austritt auch normal ausgestatteter Neutrophiler, die mit hoher Enzymaktivität reagieren (17,18). Nach Undritz (18) können auch zusätzliche fieberhafte Zustände und Infekte für die Erhöhung verantwortlich sein. Das steht in Widerspruch zu den Angaben von Lambers (9), der bei der chronischen Myelose eine generalisierte Schädigung der Granulopoese vermutet, die zur Ausbildung eines unreifen Endproduktes führt. Dadurch soll eine Aktivitätssteigerung

bei Infektionen nicht möglich sein.

Enzymsteigerungen finden sich im Verlauf chronisch myeloischer Leukämien bei Markaplasien in der Phase der einsetzenden Regeneration (18).

Die hohe aLP bei akuten Leukämien ist wahrscheinlich durch das Vorliegen einer intakten granulozytären Restpopulation (neben der paramyeloblastischen) bedingt, von der die Regeneration ausgeht. Ein beginnendes Rezidiv kann sich durch Abfall des Aktivitätsindex anzeigen (9). Unter Cortisontherapie steigt die aLP an, im Gegensatz zur chronischen Myelose. Es können Werte von 200 - 300 erreicht werden (23). Wir konnten das in 2 Fällen beobachten.

2. Berechnung des Meßfehlers für Aktivitätsindex und Prozentan- teil der enzympositiven Neutro- philen.

Zur Bestimmung des Meßfehlers wurde ein varianzanalytischer Ansatz verwendet. Unter Meßfehler soll hier der Fehler verstanden werden, der sich bei Wiederholung der Bestimmung an derselben Blutprobe ergibt. Die biologische Variation bei den Wiederholungen an denselben Patienten ist nicht eingeschlossen. Bei den vorliegenden Messungen (Doppelbestimmung zu fünf festgelegten Tageszeiten an 50 Normalpersonen) ergibt sich für den Aktivitätsindex folgende Streuungszerlegung (Tab.6)

Tab. 6

Art der Streuung	Freiheits- grade	SAQ	MAQ
1 Zwischen den Personen	49	355401.37500	7253.08923
2 zwischen den Zeiten	4	1159.07169	289.76792
12 Wechselwirkung	196	36779.24609	187.64921
zwischen den Wieder- holungen	250	9551.62500	38.20650
Gesamt	499	402891.31641	
=====			

Der Meßfehler ist die Variation zwischen den Wiederholungen:

$$s^2 = 38,20, \quad s = 6,2$$

In derselben Weise wurden bei den 50 Normalpersonen der Meßfehler für den Prozentanteil der enzympositiven Neutrophilen bestimmt (Tab.7).

Tab. 7

Art der Streuung	Freiheits- grade	SAQ	MAQ
1 Zwischen den Personen	49	11606.03809	2277.67422
2 zwischen den Zeiten	4	155.13387	38.78347
12 Wechselwirkung	196	9408.19531	48.00100
zwischen den Wieder- holungen	250	1313.87999	5.25552
Gesamt	499	122483.24805	
=====			

Die Fehlervarianz betrug 5,25, der Versuchsfehler 2,3.

Bei beiden Tabellen fiel auf, daß die Variation zwischen den Personen sehr viel größer war als der Versuchsfehler und die Schwankungen im Verlauf des Tages. Es war nicht sinnvoll, die Tagesschwankungen mit dem Versuchsfehler zu vergleichen. Daher wurde davon abgesehen. Beim Vergleich des Versuchsfehlers des Aktivitätsindex mit dem des Prozentanteiles der enzympositiven Neutrophilen fiel ein zahlenmäßiger Unterschied auf. Der Aktivitätsindex schien den höheren Versuchsfehler zu haben.

Bezieht man den Versuchsfehler auf den Mittelwert, d.h. bildet man den Variationskoeffizienten, dann ist dieser für den Aktivitätsindex sehr viel kleiner als für den Prozentanteil

der enzympositiven Neutrophilen. Das stimmt damit überein, daß die Methode für die Errechnung des Aktivitätsindex aufwendiger ist und mehr Information enthält. Von daher ist zu erwarten, daß sie etwas genauer ist.

Der Vollständigkeit halber wurde derselbe varianzanalytische Ansatz zur Ermittlung des Meßfehlers bei der Gruppe der reaktiven Leukozytosen durchgeführt und in Tab.8 für den Aktivitätsindex und Tab.9 für den Prozentanteil der enzympositiven Neutrophilen wiedergegeben.

Tab. 8

Art der Streuung	Freiheitsgrade	SAQ	MAQ
1 zwischen den Personen	29	1202673.59375	41471.50293
2 zwischen den Zeiten	4	1095.21126	273.80281
12 Wechselwirkung	116	41241.39063	355.52923
Zwischen den Wiederh.	150	7407.87500	49.38583
Gesamt	299	1252418.06250	
=====			

Tab. 9

Art der Streuung	Freiheitsgrade	SAQ	MAQ
1 zwischen den Personen	29	214112.22266	7383.18005
2 zwischen den Zeiten	4	436.57988	109.14497
12 Wechselwirkung	116	11401.76367	98.29107
zwischen den Wiederholungen	150	1116.50000	7.44333
Gesamt	299	227067.06445	
=====			

Die ermittelten Meßfehler stimmen mit denen in der Normalgruppe überein.

D i s k u s s i o n z u r B e r e c h n u n g d e s M e ß f e h l e r s .

Die Berechnung des Meßfehlers bei beiden Auswertungsmethoden für die aLP ergab bei der Aktivitätsbestimmung einen zahlenmäßig höheren Versuchsfehler, der aber auf den Mittelwert bezogen (Variationskoeffizient) kleiner war als bei der Bestimmung des Prozentanteiles der enzympositiven Neutrophilen. Das bedeutet, daß die Auswertungsmethode für den Aktivitätsindex zwar aufwendiger ist, dafür aber mehr Aussagekraft besitzt als die Ermittlung des Prozentanteiles der enzympositiven Neutrophilen.

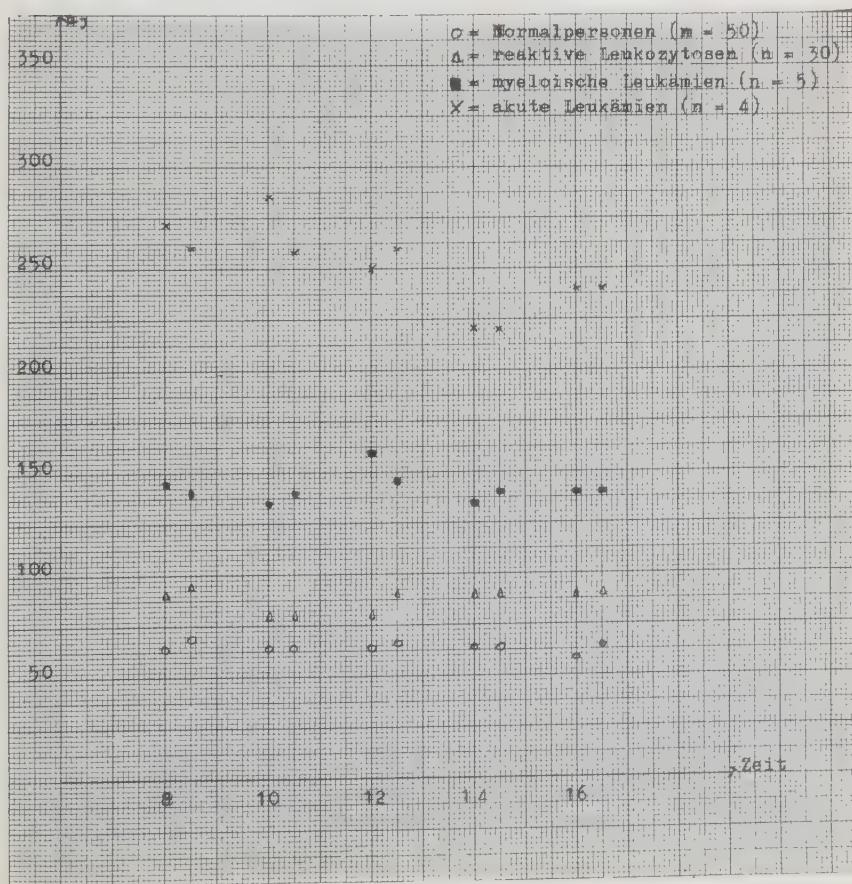
Das stimmt mit den Angaben von Merker (33) überein, der die Enzymaktivität nach drei Kriterien charakterisiert:

1. nach der Häufigkeit der enzympositiven Zellen,
2. nach der Intensität des Reaktionsausfalls,
3. nach der Häufigkeitsverteilung der in verschiedener
Stärke reagierender Neutrophilen.

3. Das Verhalten des Enzyms im Tagesprofil bei gleichzeitiger Leukozytenzählung a) bei Normalpersonen, b) bei reaktiven Leukozytosen, c) bei Blutkrankheiten.

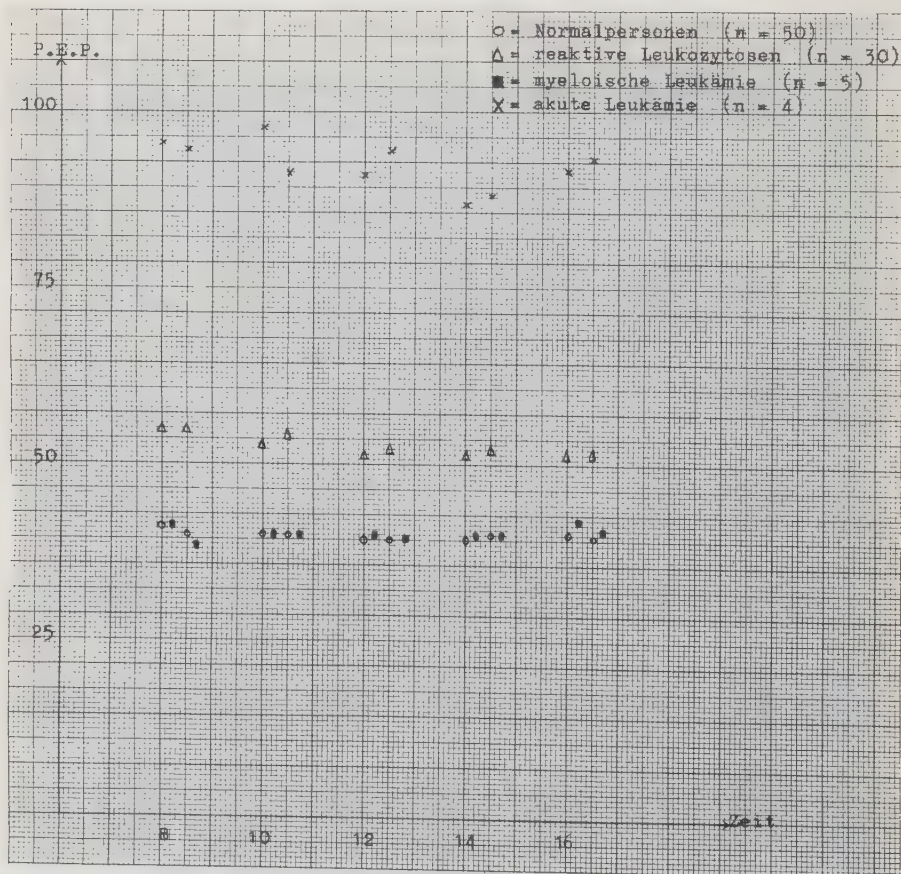
Der Verlauf des Enzyms im Tagesprofil wurde in Abb.6 für den Aktivitätsindex und in Abb.7 für den Prozentanteil der enzympositiven Neutrophilen dargestellt.

Abb. 6



Die eingezeichneten Punkte sind Mittelwerte. Die Streubreite ist übersichtshalber nicht eingezeichnet. Auf den Abszissen ist die Zeit aufgetragen, auf der Ordinate in Abb.6 der Aktivitätsindex, in Abb.7 der Prozentanteil der enzym-positiven Neutrophilen.

Abb. 7



- a) Bei den 50 Normalpersonen variieren die Mittelwerte der aLP zwischen den bestimmten Tageszeiten so gering, daß systematische Veränderungen im Tagesprofil nicht anzunehmen sind. Zur exakten Überprüfung wurde eine Varianzanalyse angesetzt (Tab.10 u. 11)
- b) Bei den 30 reaktiven Leukozytosen war ebenfalls kein Tagesverlauf des Enzyms erkennbar. Der Durchschnittswert war größer als bei Normalpersonen.
- c) Nur bei den 4 akuten Leukosen waren Tagesschwankungen erkennbar, während sich bei den myeloischen Leukämien keine Änderung der Enzymaktivität zeigte.

Um näher auf Unterschiede im Tagesverlauf zu prüfen, wurde eine Varianzanalyse nach dem Vorschlag von Koller (32) angesetzt. Die Anwendung der Varianzanalyse auf Zeitwirkungsverläufe ist in dieser Form-trotz der fehlenden Unabhängigkeit der aufeinanderfolgenden Beobachtungen-statthaft. Es ergibt sich nach der bei Koller angegebenen Berechnungsmethode folgendes Schema:

Tab. 10

Art der Streuung	SAQ	DF	MAQ	F
Zw. Zeiten	643.531	4.000	160.883	1.110
Zw. Norm./R.L.	366615.203	1.000	366615.203	35.789
Innerhalb Norm.	185056.492	49.000	3776.663	26.054
Innerhalb R.L.	613966.977	29.000	21171.275	146.053
Zw. Proband.Gs.	827170.656	79.000		
Wechselwirk. BZ	3.937	4.000	0.984	0.007
Wechselwirk. T1Z	21685.219	196.000	110.639	
Wechselwirk. T2Z	20795.609	116.000	179.272	
Reststreuung		144.95568		
Wechselwirk. TZ	42671.375	316.000		
=====				
Insgesamt	475536.562	399.000		

Für die Variation zwischen den Zeiten ergab sich ein F-Wert von 1,110, der nicht signifikant war, d.h. man konnte nicht behaupten, daß sich die Mittelwerte zu den verschiedenen Tageszeiten unterscheiden. Zwischen den Normalpersonen und den reaktiven Leukozytosen bestand ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Mittelwertes des AI ($F=35,78$). Ein unterschiedlicher Verlauf bei Normalpersonen und reaktiven Leukozytosen konnte nicht behauptet werden ($F=0,007$).

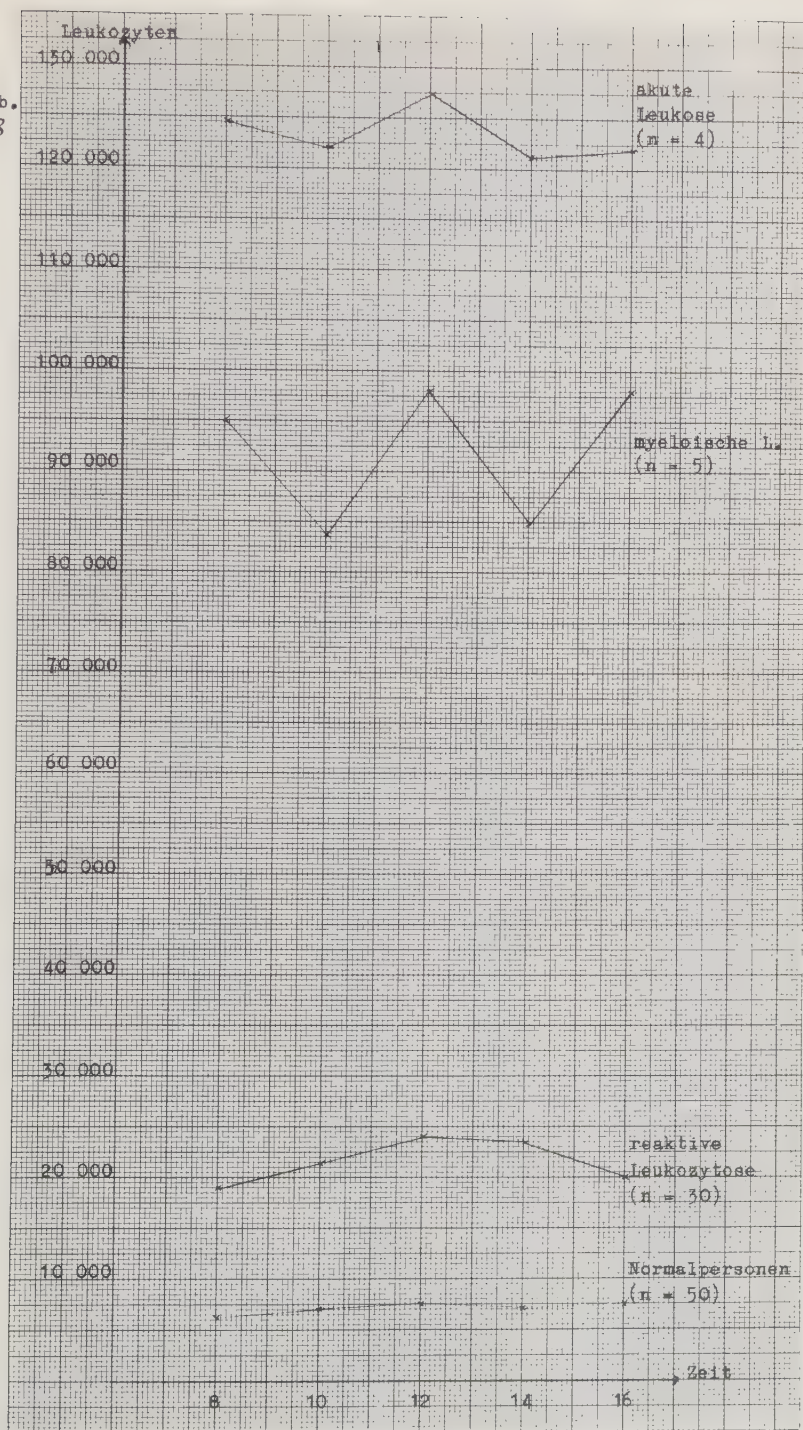
Nach der gleichen Methode prüften wir den Tagesverlauf des Prozentanteiles der enzympositiven Neutrophilen. Es ergab sich nach der Varianzanalyse folgende Streuungszerlegung (Tab.11):

Tab. 11

Art der Streuung	SAQ	DF	MAQ	F
Zw. Zeiten	164.070	4.000	41.018	0.976
Zw. Norm./R.L.	129472.156	1.000	129472.156	61.366
Innerhalb Norm.	56996.098	49.000	1163.186	27.679
Innerhalb R.L.	107571.219	29.000	3709.352	88.268
Zw. Proband. Gs.	168935.531	79.000		
Wechselwirk. BZ	-0.859	4.000	-0.215	0.005
Wechselwirk. T1Z	5319.832	196.000	27.142	
Wechselwirk. T2Z	6601.023	116.000	56.905	
Reststreuung		42.02369		
Wechselwirk. TZ	11985.633	316.000		
Insgesamt	47179.227	339.000		
=====				

Als nächstes wurde das Tagesprofil der Leukozyten untersucht (Abb.8). Eine Tagesperiodik der Leukozyten bei Normalpersonen, die sog. Verdauungsleukozytose (24,25), die Nasse (26) 1850 zum ersten Mal beschrieben hatte, konnten wir nicht bestätigen.

Abb.
8



4. Korrelationsprüfungen zwischen
der aLP und den Leukozyten, der
alkalischen Serumphosphatase,
den Eiweißfraktionen, dem Hb und
der BSG.

In Tab.12 sind die Korrelationsprüfungen bei 50 Normalpersonen
dargestellt.

Der Grenzwert für das 1%-Niveau beträgt 0,361, für das 5%-
Niveau 0,278.

Tab. 12

	aLP	P.E.P.
Alter	-0.1135	-0.2007
Ery	-0.0220	-0.1094
Hb	-0.0120	-0.0417
BSG	0.0444	0.0843
Alk. S.Phosphatase	-0.1731	-0.1415
Gesamt E.	-0.1972	-0.2056
Albumin	-0.1115	-0.1723
α_1 -Glob.	-0.0578	-0.0310
α_2 -Glob.	-0.2035	-0.1353
β -Glob.	-0.1579	-0.1955
γ -Glob.	0.3315	0.3914
P.E.P.	0.9410	
Leuko	0.1419	0.1586
Profil O	-0.9372	-0.9994
I	0.4507	0.7184
II	0.8173	0.6705
III	0.7679	0.5913
IV	0.5739	0.5337
V	0.1359	0.1453

=====

Die aLP korreliert mit den γ -Globulinen, dem Prozentanteil der enzympositiven Neutrophilen und mit den Gruppen I-IV positiv.

Eine signifikante Korrelation zu den Leukozyten, der alkalischen Serumphosphatase, dem Hb und der BSG war nicht nachweisbar.

Für den Prozentanteil der enzympositiven Neutrophilen erhielten wir die gleichen Ergebnisse. Die Korrelationen der aLP und P.E.P. mit der Gruppe O-V sind rechnerisch bedingt. Auch die Korrelation zwischen P.E.P. und aLP kommt wohl größtenteils durch rechnerische Verknüpfung zustande.

Die gleichen Korrelationsprüfungen wurden für die 30 reaktiven Leukozytosen durchgeführt (Tab.13).

Der Grenzwert für das 1%-Niveau beträgt 0,4629, für das 5%-Niveau 0,3610.

Tab. 13	aLP	P.E.P.
Alter	0.0545	-0.0121
Ery	0.0028	0.0175
Hb	-0.0333	- 0.0089
BSG	0.0605	0.1525
Alk. S.Phosphatase	0.1450	0.0613
Gesamt E.	0.2853	0.3009
Albumin	0.1774	-0.1950
α_1 -Glob.	0.2422	0.2708
α_2 -Glob.	0.1117	0.0979
β -Glob.	-0.0869	-0.0850
γ -Glob.	0.0822	0.0884
P.E.P.	0.8964	
Leuko	0.0369	0.1670
Profil O	-0.8972	-0.9998
I	0.1403	0.5413
II	0.5925	0.8209
III	0.8636	0.5675
IV	0.7275	0.4180
V	0.6654	0.4403

Bei den reaktiven Leukozytosen war keine Korrelation der aLP mit den χ -Globulinen zu erkennen, wohl aber mit den Gruppen I - V. Es bestand ebenfalls kein nachweisbarer Zusammenhang mit den Leukozyten, der alkalischen Serumphosphatase, dem Hb und der BSG.

D i s k u s s i o n z u r K o r r e l a t i o n s p r ü f u n g

Die hohe Korrelation zwischen Aktivitätsindex und Prozentanteil der enzympositiven Neutrophilen bedeutet, daß die beiden Auswertungsmethoden für die aLP sich weitgehend entsprechen.

Der Vorteil der Bestimmung des P.E.P. ist dabei die technisch leichtere Bestimmung, da die Neutrophilen nur in enzympositiv und enzymnegativ eingeteilt werden. Korrelationen zwischen der aLP und der alkalischen Serumphosphatase hinsichtlich ihrer Aktivitätslage bestehen nicht. Das entspricht den Ergebnissen anderer Autoren. Nur Weissel und Lohmann (11) fanden bei Inkubationsversuchen normaler Leukozyten in den Seren von Patienten mit erhöhter Leukozytenphosphataseaktivität, daß die Enzymaktivität durch das umgebende Plasma beeinflusst werde. Bei den 50 Normalpersonen konnte ferner eine statistische Korrelation der aLP mit den γ -Globulinen festgestellt werden, über deren Ursache und Bedeutung nichts ausgesagt werden kann.

Z u s a m m e n f a s s u n g

Bei 50 gesunden Personen sowie 30 Patienten mit reaktiver Leukozytose, 5 myeloischen und 4 akuten Leukämien bestimmten wir die alkalische Leukozytenphosphatase mit der Azo-Kupplungsmethode in der Modifikation von Merker.

Bei der Auswertung der Präparate prüften wir die klinische Anwendbarkeit zweier Bestimmungsmethoden für die aLP

1. durch Ermittlung eines Aktivitätsindex und
2. durch die Angabe des Prozentanteiles der enzympositiven neutrophilen Granulozyten.

Ferner wurde das Verhalten der aLP im Tagesprofil und die Korrelation des Enzyms mit Serumfaktoren untersucht.

Für beide Auswertungsmethoden berechneten wir den Meßfehler, der bei der Bestimmung des Aktivitätsindex relativ kleiner war.

Die Korrelationsprüfungen zwischen dem Aktivitätsindex und dem Prozentanteil der enzympositiven Neutrophilen zeigten eine so hohe Übereinstimmung, daß beide Methoden für Routineuntersuchungen als gleichwertig angesehen werden können.

Für klinische Zwecke ist die Bestimmung des Prozentanteiles der enzympositiven Neutrophilen wegen der einfacheren Durchführung vorzuziehen.

30 Patienten mit reaktiven Leukozytosen hatten erhöhte Aktivitätswerte gegenüber Normalpersonen.

Bei den myeloischen Leukämien fanden wir unterschiedliche

Werte, ebenfalls bei den akuten Leukosen, so daß eine diagnostische Hilfe hieraus nicht abgeleitet werden konnte. Die Ergebnisse der Korrelationsprüfung ließen keinen Zusammenhang zwischen der alkalischen Leukozytenphosphatase⁴ und der alkalischen Serumphosphatase erkennen. Bei den Normalpersonen wurde eine Korrelation der aLP mit den γ -Globulinen gefunden, über deren Bedeutung nichts ausgesagt werden kann. Die Schwankungen im Tagesprofil bei der aLP und den Leukozyten lagen im Zufallsbereich. Man kann also nicht behaupten, daß diese Größen zu einer der Tageszeiten systematisch unter oder über dem Tagesmittelwert liegen.

L i t e r a t u r v e r z e i c h n i s

- 1) Kaplow, L.S.: Blood 10 (1955) 1023
- 2) Merker, H. u. L. Heilmeyer: Dtsch. med. Wschr. 85 (1960) 253
- 3) Wachstein, R.: J.Lab. clin. Med. 31 (1946) 1
- 4) Gomori, G.: Proc. Soc. Exp. Biol. 42 (1939) 23
- 5) Takamatsu, H.: Tr. Soc. Path. Japan. 29 (1939) 492
- 6) Kay, J.D.: J. Exper. Path. 10 (1929) 253
- 7) Remy, D. u. M. J. Mende: Ärztl. Forsch. 8 (1957) 389
- 8) Menten, M. L., J. Junge u. M.H. Green: J. Biol. Chem. 153 (1944) 471
- 9) Lambers, K.: Dtsch. med. Wschr. 87 (1962) 1913
- 10) Tilling, W.: Med. Kl. 22 (1964) 895
- 11) Weissel, M. u. D. Lohmann: Z.f.d.Ges. Inn. Med. 1 (1963) 222
- 12) Lee, S.L.F. Rosner, A.A. Alter, F. Schultz: Xth Congr.
Int. Soc. Hematol., Stockholm (1964)
- 13) Lambers, K.: Z.d.Kl. Med. Bd. 155 (1958) 176
- 14) Merker, H. u. L. Heilmeyer: Schweiz. med. Wschr. 40 (1959) 1051
- 15) Koch, E. u. Remy, D.: Klin. Wschr. 38 (1960) 261
- 16) Wemdt, F. u. C. Budde: Folia haematologica (N.F.) Bd. 6 (1961) 149
- 17) Weissel, M.: Z.f.d. Ges. Inn. Med. 18 (1963) 577
- 18) Undritz, E.: Schweiz. med. Wschr. 44 (1965) 1515
- 19) Merker, H. Dtsch. med. Wschr. 11, 12 (1965) 484
- 20) Merker, H. Folia haematologica (N.F.) Bd. 6 (1961) 153
- 21) Merker, H. u. L. Heilmeyer: Dtsch. med. Wschr. 7 (1960) 253
- 22) Hayhoe, F.G.J., u. D. Quaglino: Brit. J. Haemat. 4 (1958) 375
- 23) Kaiser, G. u. U. Alsleben: Schweiz. med. Wschr. 1 (1963) 1
- 24) Grabner, G.: Physiol. u. Physiopathologie d. weiß. Blutzellen,
Stuttgart (1959)
- 25) Schilling, V.: 5. Kgr. europ. Ges. Haemat., Freiburg i. Br.
(1956) 196
- 26) Nasse, H.: Einfluß der Nahrung auf das Blut, Marburg (1850)
- 27) Stein, S.S., Koshland, D.E.jr.: Arch. Biochem., Biophys. 39
(1952) 229
- 28) Documenta Geigy, Wissenschaftliche Tabellen, 6. Aufl. (1960) 382

- 29) Simmer, H.: Dtsch. med. Wschr. 81 (1956) 2108
- 30) Richterich, R.: Leberkrankheiten beim Kind; Karger, Basel (1965)
- 31) Nowell, P.C. and D.A. Hungerford: A minute chromosome in human granulocytic leukaemia. Science 132 (1960) 1497
- 32) Koller, S.: Statistische Auswertungsmethoden in Rauen:
"Biochemisches Taschenbuch", Berlin-Göttingen,
Heidelberg (1964)
- 33) Merker, H.: 9. Freiburger Symposion (1963) 233
- 34) Kenny, J.J. u. Moloney, W.C.: Blood, 12 (1957)
- 35) Šrānková, L., Vanista, J., Kokian, J., Škvor, P.:
Med.Klin. 61 (1966) 21

L e b e n s l a u f

Am 2.8.1941 wurde ich, Christa Grätzel, als 2. Kind des Pfarrers Gottfried Grätzel und seiner Ehefrau Karoline geb. Rebl in Neuwürschnitz im Erzgebirge geboren.

Von 1947 bis 1949 besuchte ich die Grundschule in Dorfchemnitz und nach dem Umzug meiner Eltern die Zentralschule in Mahlis b. Oschatz i. Sa. Dort bestand ich 1955 die Abschlußprüfung. Nach der Übersiedlung nach Westberlin kam ich 1955 in die Hans-Carossa-Schule in Berlin-Spandau. Dort legte ich 1961 das Abitur ab.

Seit dem Sommersemester 1961 studiere ich an der Johannes Gutenberg-Universität in Mainz Medizin und habe mich dort im Sommersemester 1966 zur Ärztlichen Prüfung gemeldet.

